

学校编码: 10384  
学号: 24520091153036

分类号\_密级\_  
UDC\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 巯基壳聚糖的合成及其眼用纳米粒的研究

Synthesis of thiolated chitosan and preparation  
nanoparticles for ocular drug delivery

苏美琴

指导教师姓名: 朱铨副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 05 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘要

目前主要使用滴眼液治疗眼部疾病，而传统滴眼液眼表滞留时间短、药物有效浓度低等问题严重制约了其疗效。因此，研究开发具有较高生物利用度、给药方便的新型眼部制剂显得尤为重要。研究发现，壳聚糖(Chitosan, CS)经巯基化改造后所得巯基壳聚糖(Thiolated chitosan, TCS)，为另一类新型高分子黏附材料-巯基聚合物(Thiomers or Thiolated polymers)，其水溶性、黏附性等大大提高，同时具有在体凝胶特性，更有利于其眼用新制剂的开发。而纳米粒(nanoparticles, NPs)具有助溶性、控释性及眼部损伤低等优点，作为眼用制剂有广阔的应用前景。本论文旨在制备、优化 CS/TCS 纳米粒，并对其理化性质、体外细胞摄取性和体内角膜透过性等进行考察，为进一步研究此类材料及优化眼部黏附制剂提供理论依据。本论文主要包括以下内容：

### 1.TCS 的合成方法改进及评价

通过对 CS 的游离氨基进行巯基化而制得 TCS，但是现有的方法效率不高。本论文对合成方法进行改进，大大提高了反应效率，使巯基结合率从  $231.51 \pm 15.52$  提高到  $1411.01 \pm 4.02 \mu\text{mol/g}$ （每克的 CS 结合的巯基量），并对其进行了红外光谱鉴定、Ellman's 试剂法测定巯基含量及人角膜内皮（HCE）细胞相容性实验，为后续实验的开展做了充分准备。

### 2.CS/TCS-SA 纳米粒的制备及评价

本论文选用另一种生物材料海藻酸钠(Sodium alginate, SA)与 CS/TCS 通过离子交联法来制备纳米粒，过程简便、温和，无需使用有机溶剂，后处理简单。对纳米粒进行处方优化，并比较 CS/TCS-SA 纳米粒在粒径、 $\zeta$  电位、形态、黏附性及药物释放性的差异，证实 TCS-SA 纳米粒各方面性能均优于 CS-SA 纳米粒。

### 3.FITC 荧光分析方法的建立

本论文对 FITC 的荧光分析方法进行了专属性、线性、精密度和加样回收率的考察，从而建立了一种灵敏、高效、准确、方便的 FITC 荧光分析方法。

### 4.纳米粒的体外细胞摄取性

从细胞水平充分显示了 TCS-SA 纳米粒较 CS-SA 纳米粒在眼部药物传递方面

的优越性。

#### 5.在体角膜透过性实验

通过对比 FITC 溶液，包载 FITC 的 CS/TCS-SA 纳米粒的在体角膜透过性实验，进一步确证纳米粒能增加 FITC 的角膜透过量，并且 TCS-SA 纳米粒的药物角膜透过率比 CS-SA 纳米粒高得多，显示了 TCS-SA 纳米粒眼部传递系统的优越性。

**关键词：**纳米粒 壳聚糖 巯基壳聚糖 眼部传递系统 体内、外实验

## Abstract

Nowadays, eye drops are widely used in ocular disease, but the short residence time and low effective concentration have seriously restricted the therapeutic effect. Consequently, the research and development of new ophthalmic preparations which are both high bioavailability and convenient to use is more and more important. Study found that Chitosan (CS) after being thiolated to thiolated chitosan (TCS), which became another novel high polymer mucoadhesive Materials – Thiomers or Thiolated polymers, the water solubility and mucoadhesive ability of TCS are much better than CS, besides, TCS displays gelling properties in situ at physiological pH, all these properties are beneficial to the development of ophthalmic preparation. Nanoparticles for its solubility, control release ability and low eye injury, has an extensive applied foreground as a ocular drug delivery system. The study was to prepare and optimize CS/TCS nanoparticles for ocular drug delivery, and evaluate the properties of NPs, cell uptake studies and in vivo studies were carried out, all these provided theoretical bases for the further research of the material and ophthalmic mucoadhesive preparation. The following parts are included in this paper:

### 1. The improvement of the synthesis of TCS and evaluation

To thiolated the primary amino groups of CS, we got TCS, but the efficiency was low. In this research work, the synthesis route was improved, and we obtained much higher thiol group immobilization in the polymer, from  $231.51 \pm 15.52$  to  $1411.01 \pm 4.02 \mu\text{mol/g}$ . TCS characteristics were determined using Fourier transform infrared spectroscopy, the degree of thiol immobilized was measured by Ellman's reagent and the cytocompatibility with HCE (human corneal epithelium) cells.

### 2. Preparation and Characterization of CS/TCS-SANPs

The study used another biological material – Sodium alginate (SA) to prepare NPs with CS/TCS by a modified ionic gelation method which was convenient, gentle, non-organic solvent, easy after treatment. The study also optimized the preparation, and compared the differences of CS/TCS-SA NPs in size, zeta potential, morphology, mucoadhesive properties and drug release, all these came out that TCS-SA NPs was much better than CS-SANPs for ocular treatment.

### 3. The fluorescence analysis of FITC

The study determined the specificity, linearity, accuracy and plus sample recovery, to develop a sensitive, efficient, accurate, convenient method for FITC.

#### 4. In vitro cell uptake studies of FITC loaded CS/TCS-SA NPs

This may be further confirmation from the cell level that TCS-SA NPs are more effective as a potential system for ocular drug delivery, compared with CS-SANPs.

#### 5. In vivo studies

After comparing in vivo corneal permeation ability of FITC solution and FITC-loaded CS/TCS-SA NPs, we further confirmed that NPs can increase the permeation of FITC, and, TCS-SA NPs exhibited much better permeation ability than CS-SANPs, which was more effective as a potential system for ocular drug delivery.

**Keywords:** Nanoparticles; Chitosan; Thiolated chitosan; Ocular drug delivery; In vitro and in vivo studies

# 目 录

摘 要 .....	I
Abstract.....	III
第一章 课题背景.....	1
1.1 眼部给药系统的特点及研究方向.....	1
1.1.1 眼部给药系统的特点 .....	1
1.1.2 眼用制剂的研究方向 .....	2
1.2 眼用黏附性材料的应用现状.....	5
1.2.1 目前常用的眼用黏附性材料 .....	5
1.2.2 新型眼用黏附性材料 .....	6
1.3 纳米载药系统.....	10
1.3.1 纳米给药系统的定义 .....	10
1.3.2 纳米给药系统的优点 .....	10
1.4 纳米粒的制备方法.....	11
第二章 TCS 的制备.....	15
2.1 实验材料.....	15
2.1.1 实验仪器 .....	15
2.1.2 实验药品与试剂 .....	15
2.1.3 溶液配制 .....	15
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 TCS 的合成 .....	16
2.2.2 TCS 的红外表征 .....	16
2.2.3 TCS 的巯基含量测定 .....	16
2.3 结果与讨论.....	17
2.3.1 TCS 合成工艺条件的考察结果 .....	17
2.3.2 TCS 红外光谱分析 .....	21
2.3.3 TCS 巯基含量测定 .....	21
2.4 本章小结.....	23
第三章 CS/TCS-SA 纳米粒的制备与评价.....	24



<b>3.1 实验材料</b> .....	24
3.1.1 实验仪器.....	24
3.1.2 实验药品与试剂.....	24
3.1.3 溶液配制.....	24
<b>3.2 实验方法</b> .....	25
3.2.1 CS/TCS-SA 纳米粒制备.....	25
3.2.2 纳米粒的处方优化.....	25
3.2.3 FITC 载药纳米粒的制备.....	25
3.2.4 FITC 荧光分析方法的建立及包封率的测定.....	26
3.2.5 CS/TCS-SA 纳米粒的特性.....	28
3.2.6 纳米粒的黏附性评价.....	28
3.2.7 FITC 的释放度考察.....	28
3.2.8 统计分析方法.....	29
<b>3.3 结果与讨论</b> .....	29
3.3.1 CS/TCS-SA 纳米粒制备、处方优化及特性.....	29
3.3.2 FITC 荧光分析方法及包封率.....	31
3.3.3 纳米粒的黏附性评价.....	33
3.3.4 FITC 的释放度考察.....	33
<b>3.4 本章小结</b> .....	34
<b>第四章 HCE 人角膜内皮细胞摄取实验</b> .....	36
<b>4.1 实验材料</b> .....	36
4.1.1 实验仪器.....	36
4.1.2 实验试剂与耗材.....	36
4.1.3 溶液配制.....	36
4.1.4 TCS 溶液配制及纳米粒制备.....	37
4.1.5 统计分析方法.....	38
<b>4.2 实验方法</b> .....	38
4.2.1 HCE 细胞的处理.....	38
4.2.2 细胞毒性实验.....	39
4.2.3 体外细胞摄取实验.....	39
<b>4.3 结果与讨论</b> .....	40
4.3.1 TCS 的细胞相容性.....	40

4.3.2 HCE 细胞的摄取实验 .....	40
<b>4.4 本章小结</b> .....	41
<b>第五章 在体角膜透过性实验</b> .....	42
<b>5.1 实验材料</b> .....	42
5.1.1 实验仪器 .....	42
5.1.2 实验试剂与耗材 .....	42
5.1.3 实验动物 .....	42
5.1.4 溶液配制 .....	42
5.1.5 纳米粒制备及 FITC 溶液配制 .....	43
<b>5.2 实验方法</b> .....	43
<b>5.3 结果与讨论</b> .....	44
<b>5.4 本章小结</b> .....	45
<b>第六章 全文结论与展望</b> .....	46
<b>6.1 全文结论</b> .....	46
<b>6.2 展望</b> .....	47
<b>附 录</b> .....	48
<b>参 考 文 献</b> .....	49
<b>致 谢</b> .....	54
<b>攻读硕士学位期间发表的论文</b> .....	56

## Table of Contents

Abstract in Chinese .....	I
Abstract in English .....	III
Chapter 1 Background .....	1
<b>1.1 Characteristics and research aspect on ocular drug delivery</b> .....	1
1.1.1 Characteristics of ocular drug delivery. ....	1
1.1.2 Research aspect of ocular drug delivery. ....	2
<b>1.2 Development of mucoadhesive materials for ocular</b> .....	5
1.2.1 Mucoadhesive materials present commonly used in ocular. ....	5
1.2.2 Novel mucoadhesive materials. ....	6
<b>1.3 Nanoparticle drug delivery system (NDDS)</b> .....	10
1.3.1 The concept of NDDS. ....	10
1.3.2 Advantages of NDDS. ....	10
<b>1.4 Preparation methods for NPs</b> .....	11
Chapter 2 Synthesis of TCS .....	15
<b>2.1 Materials</b> .....	15
2.1.1 Experimental instruments. ....	15
2.1.2 Experimental chemicals and reagents. ....	15
2.1.3 Sample preparation. ....	15
<b>2.2 Methods</b> .....	16
2.2.1 Synthesis of TCS. ....	16
2.2.2 FT-IR of TCS. ....	16
2.2.3 -SH degree of TCS. ....	16
<b>2.3 Results and discussion</b> .....	17
2.3.1 Synthesis of TCS. ....	17
2.3.2 The FT-IR spectra of TCS. ....	21
2.3.3 -SH degree of TCS. ....	21
<b>2.4 Conclusion</b> .....	23
Chapter 3 Preparation and characteristics of CS/TCS-SA NPs .....	24
<b>3.1 Materials</b> .....	24

3.1.1 Experimental instruments . . . . .	24
3.1.2 Experimental chemicals and reagents. . . . .	24
3.1.3 Sample preparation . . . . .	24
<b>3.2 Methods</b> . . . . .	<b>25</b>
3.2.1 Preparation of CS/TCS-SA NPs. . . . .	25
3.2.2 Optimization of CS/TCS-SA NPs . . . . .	25
3.2.3 Preparation of FITC loaded NPs. . . . .	25
3.2.4 Fluorescence analytical method for FITC and encapsulation efficiency estimation. . . . .	26
3.2.5 Characteristics of CS/TCS-SA NPs . . . . .	28
3.2.6 Mucoadhesion studies of NPs. . . . .	28
3.2.7 In vitro release study of FITC. . . . .	28
3.2.8 Statistical analysis. . . . .	29
<b>3.3 Results and discussion</b> . . . . .	<b>29</b>
3.3.1 Preparation, optimization and characteristics of CS/TCS-SA NPs . . . . .	29
3.3.2 Fluorescence analytical method for FITC and encapsulation efficiency estimation. . . . .	31
3.3.3 Mucoadhesion studies of NPs. . . . .	33
3.3.4 In vitro release study of FITC. . . . .	33
<b>3.4 Conclusion</b> . . . . .	<b>34</b>
<b>Chapter 4 HCE cells uptake studies</b> . . . . .	<b>36</b>
<b>4.1 Materials</b> . . . . .	<b>36</b>
4.1.1 Experimental instruments . . . . .	36
4.1.2 Experimental chemicals and reagents. . . . .	36
4.1.3 Sample preparation . . . . .	36
4.1.4 TCS solution and NPs preparation . . . . .	37
4.1.5 Statistical analysis. . . . .	38
<b>4.2 Methods</b> . . . . .	<b>38</b>
4.2.1 HCE cells culture . . . . .	38
4.2.2 In vitro cytocompatibility studies . . . . .	39
4.2.3 In vitro cell uptake studies . . . . .	39
<b>4.3 Results and discussion</b> . . . . .	<b>40</b>
4.3.1 MTT study of TCS . . . . .	40

4.3.2 In vitro cell uptake studies .....	40
<b>4.4 Conclusion.....</b>	<b>41</b>
<b>Chapter 5 In vivo studies .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Materials .....</b>	<b>42</b>
5.1.1 Experimental instruments .....	42
5.1.2 Experimental chemicals and reagents .....	42
5.1.3 Experimental animals .....	42
5.1.4 Sample preparation .....	42
5.1.5 NPs preparation and FITC solution .....	43
<b>5.2 Methods .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Results and discussion.....</b>	<b>44</b>
<b>5.4 Conclusion.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapter 6 Conclusion and prospects.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Conclusion.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2 Prospects .....</b>	<b>47</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>48</b>
<b>References .....</b>	<b>49</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>54</b>
<b>Published paper.....</b>	<b>56</b>

## 第一章 课题背景

### 1.1 眼部给药系统的特点及研究方向

#### 1.1.1 眼部给药系统的特点

由于用眼过度和环境的逐渐恶化,近年来眼科疾病的发病率愈来愈高。随着现代社会生活水平的提高、人口老龄化、眼疾患者的增加和眼部保健要求的提高,眼用药物制剂的研究开发正呈现高速增长趋势。目前,治疗眼部疾病的最常见给药方式为眼表面和全身给药。眼部给药是治疗眼科疾病的主要途径,目前市售眼用制剂 90%以上为滴眼液和软膏剂等传统剂型。滴眼液是眼科疾病最常用的药物剂型之一,对于许多眼病,滴眼液都有直接、快捷的治疗作用。眼部独特的结构及生理功能导致传统剂型药物难以进入眼内,生物利用度小于 5%<sup>[1]</sup>,而全身给药由于血液-视网膜屏障等,仅有 2%左右的药物进入眼部发挥作用,所以,传统制剂需要大剂量频繁给药,造成多种全身不良反应。

首先需要了解一下眼睛的构造<sup>[2]</sup>。眼睛的解剖图如图 1.1。

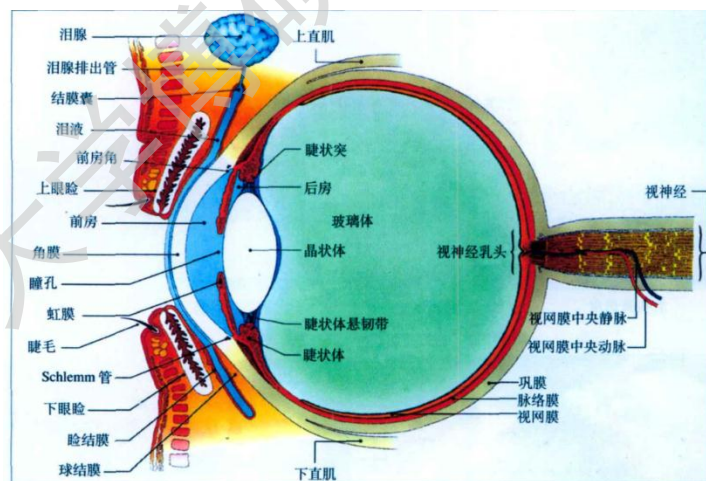


图 1.1 眼睛的解剖结构

Fig. 1.1 The anatomic structure of ocular

由于眼睛的特殊生理结构决定眼睛具有天然的将外物阻挡在眼外的功能,药物的生物利用度低。眼睛具有许多无血管成分(如角膜、晶状体和玻璃体)和中枢神经系统成分(如视网膜和视神经),眼球系由多层组织(外层为纤维膜,中层为血管膜,内层为视网膜)构成,又有许多附属器(眼睑、结膜、泪器和眼外

肌)，使角膜前给药除溢出外所剩剂量的大部分亦没有进入眼组织，而是经过结膜进入血液和鼻泪管引流至鼻粘膜/胃粘膜进入体循环。

其次，药物的眼部吸收途径。药物进入眼组织的最主要途径是通过角膜吸收，其次为非角膜途径（泪液、结膜、巩膜途径），见图 1.2。因此，提高眼用药物的生物利用度应着眼于提高药物的角膜透过率和延长药物的角膜滞留时间。所以目前的眼部给药的热点集中在研究开发具有较高生物利用度、给药方便的新型眼部传递系统及黏附性材料的开发应用上。

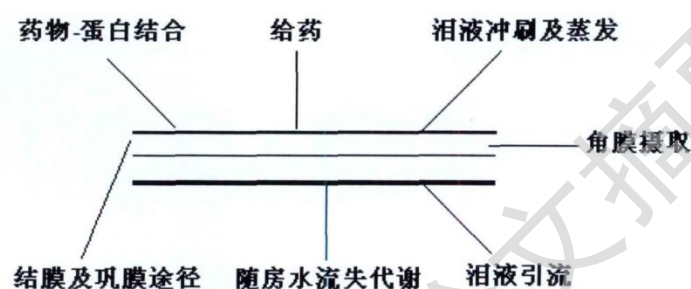


图 1.2 滴眼液给药后的吸收途径

Fig. 1.2 The absorption routes of eye drops

目前，已有研究致力于开发延长药物与眼表的接触时间，同时能减慢药物清除速率，从而增加药物角膜渗透率的眼部新剂型，如：眼用植入剂、胶原滤膜、胶体系统（如脂质体、纳米粒和纳米囊等），这些技术在不同程度上提高了药物的生物利用度，有些制剂的浓度可达到治疗玻璃体疾病的最低有效治疗浓度，但表面活性剂与助表面活性剂等的加入限制了制剂的应用；此外，制剂的稳定性问题也是这类研究的重点和难点<sup>[3]</sup>。

### 1.1.2 眼用制剂的研究方向

#### （一）单剂量包装

现在的滴眼剂为多剂量包装，为防止滴眼剂多次开启后药液染菌，滴眼剂中必须加入防腐剂。最近的研究表明，滴眼剂中某些常用的防腐剂，如苯扎溴铵、醋酸氯己定等，长期、频繁的应用会对角膜上皮有不同程度的损害。为此，研制单剂量的滴眼剂，使其不含防腐剂，可进一步提高产品质量，减少防腐剂长期使用的毒副作用。

#### （二）新剂型、新技术的应用

普通滴眼剂最突出的问题是生物利用度较低，其主要原因是滴入结膜囊内的滴眼液通过泪液稀释、鼻泪管流失、与蛋白质结合等途径，易迅速消除，使药物的作用时间不足。因此，迫切需要利用新剂型、新技术，提高产品的技术含量，改造旧的、传统的眼用制剂，提高眼用药物的生物利用度，开发新的眼用制剂。目前国内外采用的新技术和开发的新剂型如下。

### 1. 脂质体

脂质体(liposomes)是一种定向药物载体，它具类细胞结构。脂质体眼部给药可以解决普通滴眼剂不能在一个较长时间内提供和维持足够的药物浓度这一缺陷。由于脂质体的特殊结构，它既可以在眼内迅速释放药物，又具有缓释性能(“缓释”可以降低某些药物毒性)，还能增强药物对角膜的通透性，起到增效作用。在治疗细菌性眼内炎、病毒性角膜炎或角膜溃疡等方面，脂质体将是一种重要剂型。

### 2. 亲水凝胶

凝胶是一种交联的高聚物(high polymer)或共聚物(copolymer)吸收大量水分形成的溶胀状态的半固体，其交联方式有离子键、共价键、氢键等。这种聚合物可以是水溶性的，也可以是水不溶性的，前者即亲水凝胶<sup>[4]</sup>。亲水凝胶适于眼部等敏感性部位的给药。药物以眼用亲水凝胶方式给药的特点如下：①延长药物的释放时间；②保持药物在结膜囊内的有效浓度；③降低某些药物的刺激性；④避免普通油脂性眼膏剂产生的“糊视现象”。

### 3. 微球

微球是一种用适宜高分子材料为载体包裹或吸附药物而成的球形或类球形微粒，属于胶体范畴。微球能保护药物免遭破坏，因此，在水溶液中不稳定的药物或水溶性差的药物都可以制成微球。眼用药物微球制剂的特点是延效，还可以克服一般滴眼剂易在角膜前被清除的缺点。治疗青光眼、炎症和眼部感染的药物适于制成微球。

### 4. 眼用植入剂

眼用植入剂<sup>[5]</sup>是一种长效定量缓释新制剂，可长期在眼内达到有效治疗浓度，适用于治疗需要长期给药的多种眼科慢性疾病。按植入剂载体(空植入剂)在药物释放过程中能否降解，可分为不溶性眼用植入剂与可溶性眼用植入剂，前者在药物完全释放后须取出空植入剂。与普通眼用制剂相比较，眼用植入剂有以下优点：



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库